

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

ゲノムワイドな遺伝的相関解析による乾癬感受性遺伝子の同定

研究協力者 小澤 明 東海大学医学部専門診療学系皮膚科学 教授

**研究要旨** 汎発性膿疱性乾癬の免疫遺伝学的背景、病態形成機序を解明することを目的とし、その前段階として、尋常性乾癬について解析を行う。平成17年度は、マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的相関解析で絞り込んだ領域について、SNPを用いてさらに絞り込み、発現している遺伝子の解析に着手した。これらの解析手順・解析結果を踏まえて、汎発性膿疱性乾癬の遺伝子解析に応用していく。

梅澤慶紀

東海大学医学部専門診療学系講師  
馬淵智生

東海大学医学部専門診療学系助手  
猪子英俊

東海大学医学部分子生命科学教授  
岡 晃

東海大学医学部分子生命科学助手  
中山樹一郎

福岡大学医学部皮膚科学教授  
久保田由美子

福岡大学医学部皮膚科学助教授  
照井 正

日本大学医学部皮膚科学教授  
小澤麻紀

東北大学大学院医学部内科病態学助手  
橋本 隆

久留米大学医学部皮膚科学教授  
安元慎一郎

久留米大学医学部皮膚科学助教授  
池田志孝

順天堂大学医学部皮膚科学教授  
松本義也

愛知医科大学皮膚科学教授  
飯島正文

昭和大学医学部皮膚科学教授  
末木博彦

昭和大学医学部皮膚科学教授

**A. 研究目的**

汎発性膿疱性乾癬の免疫遺伝学的背景、病態形成機序を解明する。

**B. 研究方法**

平成14年度より多施設から集めた尋常性乾癬患者群および健康対照群の血液由来のDNAを対象とし、全染色体にわたって設定した26,061個のマイクロサテライトマーカーを用いてゲノムワイドに遺伝的相関解析を行っている。

これまでに尋常性乾癬患者 437 例のうち 375 例を 3 群（各 125 例）に分けて、3 回のスクリーニングを行った。平成14年度には 1 次スクリーニングを行い、2,065 個のマーカーに有意な相関が認められた。平成 15、16 年度には 2 次、3 次スクリーニングを行った。2 次スクリーニングでは、2,065 個のマーカーのうち 495 個に、3 次スクリーニングでは、これら 495 個のうち 158 個に有意な相関が認められた。さらに偽陽性を排除するため、1～3 次の各集団を対象として、再度、遺伝的相関解析を行い、最終的に有意な相関が認められたマーカーを 37 個に絞り込んだ。

平成17年度は、このうち相関の強い16領域を対象とし、772 個の SNP マーカーによる遺伝的相関解析と、発現している遺伝

子の解析を進めている。

### C. 研究結果

相関の強い16領域のうちの1領域である Candidate Region 1 (仮称) について、57個の SNP をマーカーとして遺伝的相関解析を行ったが、有意な頻度差を示す SNP は認められなかった。そこで Clark 法によるハプロタイプ推定を行ったが、有意な頻度差を示すハプロタイプも認められなかった。しかしながら、陽性マイクロサテライトマーカーの相関は強いので、この領域に存在する4つの遺伝子、とくに陽性マイクロサテライトの最も近傍に位置する gene 3 (仮称) について解析を行った。この遺伝子は、塩基配列ならびに推定アミノ酸配列より G タンパク連結型受容体のスーパーファミリーの1つと考えられた。

また、汎発性膿疱性乾癬の遺伝子解析にむけてサンプリングを継続した。

### D. 考察

マイクロサテライトをマーカーとしたゲノムワイドな遺伝的相関解析は、すべての解析 (Pooled DNA typing での1~3次スクリーニングと Individual typing) を完了した。最終的に37個のマーカーに有意な相関が認められ、これらの領域に、乾癬の疾患感受性遺伝子が存在しているものと確信している。

これら37個のマーカーについて、SNP をマーカーとした遺伝的相関解析を行い、連鎖不平衡を示す領域の絞り込み、発現遺伝子解析を行っている。現在、相関の強い16領域を解析しており、今年度中に数個の感受性遺伝子を同定できると考えている。

### E. 結論

本解析で得られた情報と、これまでに行ったマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリング結果とを照らし合わせることで、より迅速な疾患関連遺伝子の

同定を目指す。その手法を生かして、汎発性膿疱性乾癬の遺伝子解析を進める。同時に、多施設の協力を得て、汎発性膿疱性乾癬のサンプリングを進める。

### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

### G. 研究発表 (平成17年度)

#### 1. 論文発表

英語論文

1. Yasunari Mastuzaka, Koichi Okamoto, Tomotaka Mabuchi, Mariko Iizuka, Akira Ozawa, Akira Oka, Gen Tamiya, Jerzy K. Kulski and Hidetoshi Inoko: Identification and characterization of novel variants of the thioredoxin reductase 3 new transcript 1 TXNRD3NT1. **Mamm Genome** 16: 41-49, 2005
2. Kulski JK, Kenworthy W, Bellgard M, Taplin R, Okamoto K, Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Tamiya G, Inoko H: Gene expression profiling of Japanese psoriatic skin reveals an increased activity in molecular stress and immune response signals. **J Mol Med** 83: 964-975, 2005

日本語論文

1. 根本 治、赤坂英俊、菅井順一、大槻マミ太郎、岸本恵美、江藤隆史、梅澤慶紀、小澤 明、磯田憲一、水谷 仁、中山樹一郎、中川秀己. 尋常性乾癬治療における高濃度活性型ビタミン D3 外用薬の位置付け. マキサカルシトール 25  $\mu$ g/g 軟膏と酪酸プロピオン酸ベタメタゾン 0.5mg/g 軟膏との左右比較オープン試験. **臨床皮膚科** 59: 448-452, 2005

2. 梅澤慶紀、馬淵智生、太田幸則、松山孝、小澤 明. 小児の汎発性膿疱性乾癬の1例—汎発性膿疱性乾癬治療ガイドラインに基づく治療の試み—. 日本小児皮膚科学会雑誌 24:37-40, 2005
  3. 安元慎一郎、橋本 隆、中山樹一郎、小澤 明、中川秀己. 乾癬治療におけるシクロスポリンMEPC療法—西部支部会員によるアンケート調査—. 西日本皮膚科 67:252-257, 2005
  4. 中川秀己、五十嵐敦之、江藤隆史、小澤 明、根本 治. 乾癬における患者満足度調査(第二報)—患者満足度に影響を及ぼす因子の検討—. 日本皮膚科学会雑誌 115:1449-1459, 2005
  5. 梅澤慶紀、小澤 明. EL-B2-1 新世紀の乾癬の病態と治療を考える. 日本皮膚科学会雑誌 115:1942-1944, 2005  
日本語著書  
なし
2. 学会発表
  1. 太田幸則、岩下賢一、梅澤慶紀、松山孝、小澤 明、塚本秀雄. 分化誘導刺激に伴う表皮細胞c-Myc/Mad family 遺伝子発現の検討 Altered expression of c-Myc/Mad gene family mRNA on keratinocyte by differentiation-promoting factor, 日本研究皮膚科学会第30回年次学術大会・総会、平成17年4月20—22日、横浜
  2. T. MABUCHI, A. OKA, M. IIZUKA, K. IWASHITA, Y. UMEZAWA, Y. OHTA, T. MATSUYAMA, H. INOKO, Y. Kubota, J. Nakayama, M. Ozawa, T. Terui, S. Yasumoto, T. Hashimoto, S. Ikeda, Y. Matsumoto, H. Sueki, M. Iijima and A. OZAWA. Genome-wide association study of psoriasis using polymorphic microsatellite markers, 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 平成17年5月4—7日, St. Louis, USA
  3. UMEZAWA Yoshinori, AKASAKA EMIKO, MABUCHI Tomotaka, OHTA Yukinori, MATSUYAMA Takashi and OZAWA Akira. AN ATTEMPT AT NEW REGIMEN OF SYSTEMIC THERAPY WITH CYCLOSPORINE BASED ON PHARMACOKINETICS IN PSORIASIS, The 9<sup>th</sup> Annual Meeting The Korean Society for Psoriasis, The Korean Society for Psoriasis, 平成17年5月14日, Seoul, Korea
  4. 松浦浩徳、岩月啓氏、梅澤慶紀、小澤 明、市來善郎、北島康雄、中村晃一郎、金子史男. 膿疱性乾癬の疫学解析、第20回日本乾癬学会、平成17年9月9—10日、軽井沢
- H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)**
1. 特許取得  
特記すべき事項なし
  2. 実用新案登録  
特記すべき事項なし
  3. その他  
特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

膿疱性乾癬の病因と治療

—膿疱性乾癬における Kogoj 海綿状膿疱の形成メカニズムの解析—

研究協力者 照井 正 日本大学医学部皮膚科 教授

**研究要旨** 膿疱性乾癬では好中球が肉眼的な膿疱を形成するし、好中球をターゲットとする治療が奏功することから、好中球が本症の病変形成に重要な役割を果たしていると考えられる。病理組織学的に病初期から好中球が表皮内に浸潤し、肉眼的な膿疱形成の時期には浸潤した好中球の集まりに一致して表皮細胞の変性像（Kogoj 海綿状膿疱）がみられる。これまで、好中球集積に IL-8 と補体由来の C5a アナフィラトキシンが共同して関与すること、膿疱性乾癬病変部の膿疱周囲ケラチノサイト（EK）は Fas だけでなく FasL を発現し、膿疱内に浸潤した好中球は発現していること、すなわち、好中球と EK 自身の発現する FasL が引き金となり、Fas を発現する EK の apoptosis を誘導することが示唆されている。上記実験結果を機能的に確認する目的で三次元培養ヒト皮膚を用いて、角層側あるいは基底層側から好中球を添加した。前者の場合、IFN $\gamma$  と非動化していない FBS（補体成分を含む）を加え一晩培養した後、好中球を添加すると好中球集積像が再現できた。後者の場合、補体が関与しない条件でも、好中球の基底層への浸潤が観察された。今回使用した実験系では、膿疱性乾癬の Kogoj 海綿状膿疱を再現することはできなかったが、昨年度報告した乾癬の免疫組織学的研究成果を裏付けるように基底層までの好中球浸潤には IFN $\gamma$  が重要であるが、角層への浸潤には IFN $\gamma$  とともに補体の活性化が関与することが示された。

共同研究者

篠島由一

日本大学医学部皮膚科 大学院

清水秀直

日本大学医学部皮膚科 助手

原 弘之

日本大学医学部皮膚科 助教授

中球の通過できる  $3\mu\text{m}$  を使用した。

表皮細胞の刺激に用いた IFN $\gamma$  と FBS は Sigma より購入した。

ヒト好中球は静脈血から Polymorphoprep<sup>®</sup> を用いて遠心分離した。

### C. 研究結果

前年度の研究成果で膿疱周囲のケラチノサイト（EK）は Fas だけでなく FasL を発現し、膿疱内に浸潤した好中球は Fas を発現していなかったが、FasL を発現していた。以上の結果から膿疱性乾癬では好中球と EK 自身の発現する FasL が引き金となり、Fas を発現する EK の apoptosis を誘導することが推察された。以上の上記実験結果を機能的に確認する目的で三次元培養ヒト皮膚を用いて、好中球の集積について検討した。

### A. 研究目的

膿疱性乾癬の病変部における Kogoj 海綿状膿疱の形成における好中球の役割を明らかにする。

### B. 研究方法

二次元培養に用いた表皮細胞と三次元培養ヒト皮膚 J-TEC（Japan）より購入した。表皮の乗っているメンブレンのポアサイズは通常型  $0.4\mu\text{m}$  と特別仕様として好

まずはじめに、三次元培養ヒト皮膚の角層側から好中球を添加した。低容量の IFN  $\gamma$  を加え一定時間培養した後、好中球と共培養した（8時間）。好中球の集積は認められなかった。次いで、IFN  $\gamma$  とともに活性を保持する補体成分を補い（0.5% FBS）一晚培養した後、好中球と共培養したところ角層内～角層下への好中球集積像が再現できた。IFN  $\gamma$  を加えずに、0.5% FBS のみと前培養しても好中球の浸潤は認められなかった。

次に好中球を基底細胞側から添加する方法を試みた。通常、3次元培養ヒト表皮の乗っているメンブレンのポアサイズは通常  $0.4\mu\text{m}$  である。このポアサイズでは好中球が通過できないため、特別仕様としてポアサイズ  $3\mu\text{m}$  での作成を依頼した。しかし、ポアサイズ  $3\mu\text{m}$  で作成した場合、培養表皮細胞はメンブレンの小口を通過してしまい、メンブレンの両面に広がり観察には適さなかった。

そこで、通常市販されている  $0.4\mu\text{m}$  ポアサイズの3次元培養ヒト表皮を摂子で慎重に剥がし、角層側を下に基底層側を上にして、好中球を添加する方法を行った。この際、3次元培養ヒト表皮を IFN  $\gamma$  添加して15時間培養した後で、さらにその上に好中球を添加し、8時間あるいは24時間培養後に3次元培養ヒト表皮を採取し組織学的に観察した。

光顕レベルでは、何れの条件で培養した表皮も基底層を含めて配列の乱れもなく著変はなかった。好中球を添加後8時間では、基底層から角層へと浸潤する好中球はみられなかったが、基底層に好中球が付着する像がみられた。しかし、24時間後ではほとんどの好中球は消失していた。

#### D. 考察

膿疱性乾癬病変部における Fas と FasL の発現を免疫組織組織学的に検討した。その結果、膿疱形成周囲 EK は Th1 サイト

カインなどの影響を受け、apoptosis 誘導能を持つ Fas を発現していることが判かった。さらに、膿疱内に集積した好中球は Fas に結合する Fas L を発現し EK の apoptosis 誘導に関与していることが示唆された。加えて、TEN の病変部と同様に膿疱周囲 EK はそれ自身 FasL を発現していることが明らかとなった。その事実を機能的に解析できるモデル作成を試みた。三次元培養ヒト皮膚を使用し、好中球との関係について検索した。

角層から好中球を添加した場合、IFN  $\gamma$  ( $0.01\sim 100\text{ng/ml}$ ) 単独処理では好中球集積像は観察されなかったが、IFN  $\gamma$  とともに非動化していない血清 10.5% FBS を添加すると角層内～角層下に好中球の集積像が観察された。この事実から、IFN  $\gamma$  の影響（IL-8 の産生など）と補体の活性化が重要であること示唆された（図1）。

今回、より *in vivo* に近い状況を再現するため、好中球を基底層側から添加することを試みた。3次元培養ヒト表皮を載せているメンブレンのポアサイズが小さく好中球が通過できないため、ポアサイズ  $3\mu\text{m}$  での作成したが、表皮細胞も通過するため、実験に適さなかった。

次に3次元培養ヒト表皮を摂子で剥がし、角層側を下に基底層側を上にして、好中球を添加する方法を行った。IFN  $\gamma$  を添加すると基底層に好中球が付着している像がみられた（図2）。しかし、基底層から角層へと浸潤する好中球はみられなかった。

#### E. 結論

以上のように、これまでの *in vitro* の結果から、好中球による Kogoj 海綿状膿疱と類似した変化を再現することは出来なかった。しかし、基底層側から好中球を添加した実験から、基底層への好中球浸潤には IFN  $\gamma$  が関与し、角層への好中球付着には IFN  $\gamma$  とともに補体が関係していること、好中球が表皮細胞間を移動するには

他の要素が必要であることが判った。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表（平成17年度）

##### 1. 論文発表

英語論文

1. Ozawa M, Terui T, Tagami H: Localization of IL-8 and complement components in lesional skin of psoriasis vulgaris and pustulosis palmaris et plantaris. **Dermatology** 211:249-55, 2005.

日本語論文

1. 照井 正. 膿疱性疾患の診断に必要な検査と鑑別疾患. 実践. 外来に必要な皮膚科検査法ハンドブック. 編集企画 原田敬之、編集主幹 飯島正文、塩原哲夫. 全日本病院出版会. pp109-117, 2004.
2. 照井 正. 好中球. 皮膚免疫ハンドブック. 改訂2版 編著 玉置邦彦、塩原哲夫. 中外医学社. pp63-70.2005
3. 照井 正. 角層下膿疱症 (Sneddon-Wilkinson 病). 特集: 環状を呈する皮膚病変. 責任編集 飯塚 一. **Visual Dermatol** 4 (2):150-151, 2005.
4. 照井 正. 掌蹠膿疱症. 改訂第4版疾

患別最新処方. メディカルビュー社 (東京) 監修者: 矢崎義雄、菅野健太郎. pp756-757, 2005 (3月30日) (全956p)

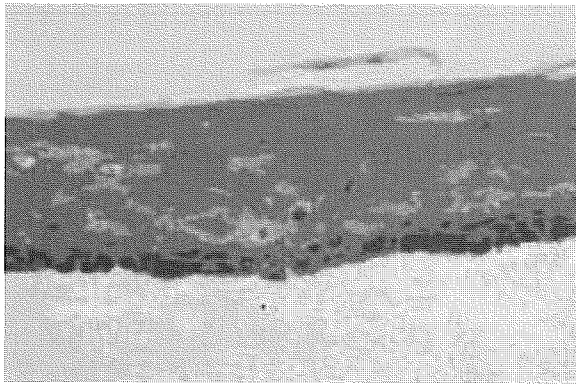
5. 照井 正. 皮膚の免疫機能. 化粧品・外用薬研究者のための皮膚科学. 編著 宮地良樹、長沼雅子. 文光堂 (東京) pp30-35.
6. 照井 正. 臨床講義 乾癬の病態と治療. **皮臨** 47 (6):807-814, 2005.
7. 照井 正. 汎発性膿疱性乾癬. 9. 水疱・膿疱を示す疾患. 実践 皮膚病変のみかた. (監修・編集: 西岡 清、片山一郎、勝岡憲生、川名誠司、斉藤隆三) **日本医師会雑誌** 134 (特別号2): S129, 2005.

##### 2. 学会発表

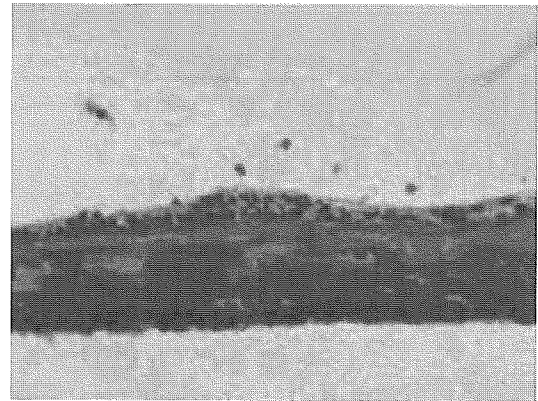
なし

#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし

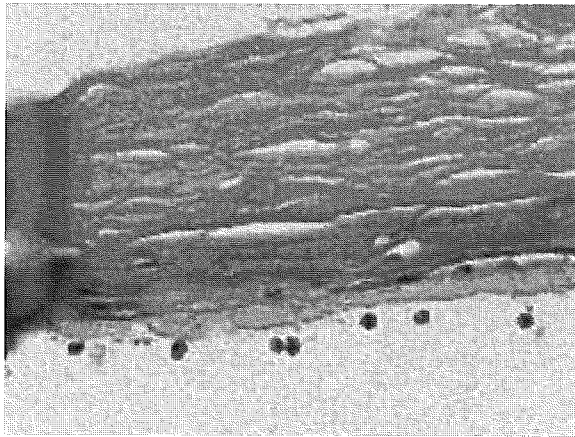


A) IFN  $\gamma$  単独

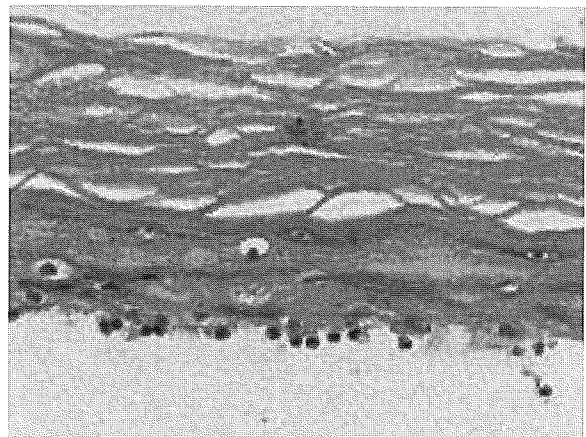


B) IFN  $\gamma$  と FBS

図1. 角層側から好中球を添加した場合：IFN  $\gamma$  と非動化していない血清との preincubation で好中球の角層内集積が誘導された。A：IFN  $\gamma$  (100~0.01ng/ml) 単独の preincubation (overnight) では角層内への好中球浸潤は認められなかった。B) IFN  $\gamma$  (0.05ng/ml) に加えて活性の保持されている補体成分をふくんでいる FBS (0.5%) を添加して preincubation (overnight) した後、好中球と加えて培養 (8時間) すると角層内に多数の好中球が集積する像が再現できた。



A) IFN  $\gamma$  なし



B) IFN  $\gamma$  添加

図2. 基底層側から好中球を添加した場合：IFN  $\gamma$  を添加すると基底層に好中球が付着している像がみられた (B)。IFN  $\gamma$  を添加しないと培養細胞から離れて好中球が損じますが付着する好中球の数は少ない (A)。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation  
—遺伝子解析と電顕的検索—

分担研究者 清水 宏 北海道大学大学院医学研究科・皮膚科学分野 教授

**研究要旨** 単純型表皮水疱症の一亜型である epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation (EBS-MP) は機械的水疱と色素沈着、角化異常を特徴とする。現在までこの疾患で検出されているのはケラチン5 遺伝子の変異 P25L のみである。EBS-MP 1 家系 2 症例において、ケラチン5 遺伝子を検索したところ 2 症例とも P25L の変異が確認された。また EBS-MP に特徴的な疣贅状の角化病変を電顕により観察したところ表皮基底細胞内においてデスモゾームとケラチン線維の結合不全が観察された。これらの所見よりケラチン5 における 25 番目のプロリンはケラチン線維とデスモゾームの結合に関与しており、その異常によって角化異常が引き起こされると考えられた。

研究協力者

安川香菜 北海道大学大学院医学研究科・  
皮膚科病学分野  
澤村大輔 北海道大学大学院医学研究科・  
皮膚科病学分野  
後藤真希 北海道大学大学院医学研究科・  
皮膚科病学分野

に基づき、対象者に対して十分な説明を行い、書面による個人の意思に基づく任意の同意を得ており、北海道大学医学部倫理委員会で承認されている。患者およびその家族、血縁者のプライバシー、人権の保護に配慮し、学問的理由で結果を公表するときには、個人が特定できないよう十分に配慮する。たとえ解析途中でも、患者、家族、血縁者は同意を撤回でき、何ら診療上の不利益を受けないことが保証されている。

A. 研究目的

EBS-MP においては、現在までケラチン5 遺伝子の25番目のプロリンがロイシンに変わる変異のみが検出される。今回我々は、1 家系 2 例の EBS-MP 患者について、変異検索を行い、角化病変を電顕にて観察したので報告する。

B. 研究方法

電顕的検索にて、基底細胞内外の微細構造の異常を検討した。ならびに末梢血単核球から抽出した genomic DNA を用いてケラチン遺伝子変異検索をダイレクトシーケンス法を用いて施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は、インフォームド・コンセント

C. 研究結果

患者

症例 1：2 歳の女兒 (図 1 a-c)。出生 1 カ月後から掌蹠にびらんと水疱が出現。次第に腋窩、手首、手背、臍径に網目状の色素沈着と疣状の角化性丘疹を伴うようになった。

症例 2：30 歳男性 (図 1 d-e)。症例 1 の父親。幼少時より掌蹠に水疱の新生を繰り返す。しだいに網目状の色素沈着が間擦部より生じ、顔面を除くほぼ全身に広がった。掌蹠に疣状の角化性丘疹と部分的な角質肥厚を認める。



電顕的検索：患者皮膚生検標本での水疱形成部位は、症例1、2ともに、基底細胞内であり、単純型に一致する所見であった。基底細胞内ではケラチン線維の偏位やメラノゾームの密集像が観察された。また一部のデスモゾームにはケラチン線維との結合不全が認められた。(図2)

遺伝子検索：ケラチン5遺伝子の変異検索を行った。その結果、症例1、症例2共にP25L変異が同定された。(図3)

#### D. 考察

EBS-MPは現在まで7家系で遺伝子解析が行われているが、ケラチン5遺伝子のP25Lの変異のみが同定されている。よってこのケラチン5遺伝子の25番目のプロリンの異常が色素沈着や角化病変などEBS-MPの特徴的な臨床所見をひき起こしていると考えられる。この結果を裏付けるように今回遺伝子解析を行ったEBS-MP1家系2症例にも同じ変異が検出された。

25番目のプロリンはケラチン5分子の頭部であるN末端V1ドメイン内に位置している。この部位はデスモゾーム構成分子であるデスモプラキンのC末端と直接結合する部位であることが知られている。最近このデスモゾーム構成分子のデスモプラキンやデスモグレインの遺伝子変異にてデスモゾームとケラチン線維との結合不全が生じると掌蹠に角化異常が生じることが判明してきた。

我々はEBS-MPにおける角化異常もこのデスモゾームとケラチンの結合不全が関与するのではないかという仮説のもと電顕的検索を行った。従来報告されてきた表皮内での水疱形成、メラノゾームの密集、ケラチン線維の偏位などのEBS-MPに特徴的な所見の他に、一部のデスモゾームではケラチン線維との結合不全が観察された。よってケラチン5の25番目のプロリンはケラチン線維とデスモゾームの結合に関与しており、その異常が水疱形成のみならず角

化異常をもひき起こしていることが明らかになった。

#### E. 結論

今回、EBS-MPの変異検索と電顕的観察を報告した。ケラチン線維とデスモゾームの結合不全が角化異常をひき起こす詳細なメカニズムについてははまだ明らかではなく、詳しく検討する必要があると思われる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表(平成17年度)

論文発表 英語論文

1. Yasukawa K, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Jung SY, Kim SC, Shimizu H: Epidermolysis bullosa simplex in orientals: genetic studies in 19 cases. **Br J Dermatol** in press.
2. McMillan JR, Akiyama M, Nakamura H, Shimizu H: Colocalization of Multiple Laminin Isoforms Predominantly beneath Hemidesmosomes in the Upper Lamina Densa of the Epidermal Basement Membrane. **J Histochem Cytochem.** 54:109-118, 2006.
3. Akiyama M, Sugiyama-Nakagiri Y, Sakai K, McMillan JR, Goto M, Arita K, Tsuji-Abe Y, Tabata N, Matsuoka K, Sasaki R, Sawamura D, Shimizu H: Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer. **J Clin Invest** 115:1777-1784, 2005.
4. Akiyama M, Tsuji-Abe Y, Yanagihara M, Nakajima K,

- Kodama H, Yaosaka M, Abe M, Sawamura D, Shimizu H: Ichthyosis bullosa of Siemens: its correct diagnosis facilitated by molecular genetic testing. **Br J Dermatol** 152:1353-1356, 2005.
5. Horiguchi Y, Sawamura D, Mori R, Nakamura H, Takahashi K, Shimizu H: Clinical heterogeneity of 1649delG mutation in the tail domain of keratin 5: a Japanese family with epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. **J Invest Dermatol** 125:83-85, 2005.
  6. Kawasaki H, Sawamura D, Nakazawa H, Hattori N, Goto M, Sato-Matsumura KC, Akiyama M, Shimizu H: Detection of 1733insC mutations in an Asian family with Birt-Hogg-Dube syndrome. **Br J Dermatol** 152:142-145, 2005.
  7. Kawashima J, Akiyama M, Takizawa Y, Takahashi S, Matsuo I, Shimizu H: Structural, enzymatic and molecular studies in a series of nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma patients. **Clin Exp Dermatol** 30:429-431, 2005.
  8. Mitsui H, Watanabe T, Komine M, Nakamura H, Shimizu H, Tamaki K: Focal palmoplantar callosities in non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa. **J Am Acad Dermatol** 52:371-373, 2005.
  9. Nakamura H, Sawamura D, Goto M, McMillan JR, Park S, Kono S, Hasegawa S, Paku S, Nakamura T, Ogiso Y, Shimizu H: Epidermolysis bullosa simplex associated with pyloric atresia is a novel clinical subtype caused by mutations in the plectin gene (PLEC1). **J Mol Diagn** 7:28-35, 2005.
  10. Natsuga K, Akiyama M, Sato-Matsumura K, Tsuchiya K, Shimizu H: Two cases of atypical melanocytic lesions in recessive dystrophic epidermolysis bullosa infants. **Clin Exp Dermatol** 30:636-639, 2005.
  11. Sawamura D, Abe R, Goto M, Akiyama M, Hemmi H, Akira S, Shimizu H: Direct injection of plasmid DNA into the skin induces dermatitis by activation of monocytes through toll-like receptor 9. **J Gene Med** 7:664-671, 2005.
  12. Sawamura D, Goto M, Shibaki A, Akiyama M, McMillan JR, Abiko Y, Shimizu H: Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect for bacterial infection. **Gene Ther** 12:857-861, 2005.
  13. Sawamura D, Goto M, Yasukawa K, Sato-Matsumura K, Nakamura H, Ito K, Tomita Y, Shimizu H: Genetic studies of 20 Japanese families of dystrophic epidermolysis bullosa. **J Hum Genet** 28:28, 2005.
  14. Shimizu A, Akiyama M, Ishiko A, Yoshiike T, Suzumori K, Shimizu H: Prenatal exclusion of harlequin ichthyosis; potential pitfalls in the timing of the fetal skin biopsy. **Br J Dermatol** 153:811-814, 2005.
  15. Suzuki N, Suzuki T, Inagaki K, Ito S, Kono M, Fukai K, Takama H, Sato K, Ishikawa O, Abe M, Shimizu H, Kawai M, Horikawa T, Yoshida K, Matsumoto K, Terui

- T, Tsujioka K, Tomita Y: Mutation analysis of the ADAR1 gene in dyschromatosis symmetrica hereditaria and genetic differentiation from both dyschromatosis universalis hereditaria and acropigmentatio reticularis. **J Invest Dermatol** 124:1186-1192, 2005.
16. Tomita Y, Akiyama M, Shimizu H: Stratum corneum hydration and flexibility are useful parameters to indicate clinical severity of congenital ichthyosis. **Exp Dermatol** 14:619-624, 2005.
17. Tsuji-Abe Y, Akiyama M, Yamanaka Y, Kikuchi T, Sato-Matsumura KC, Shimizu H: Correlation of clinical severity and ELISA indices for the NC16A domain of BP180 measured using BP180 ELISA kit in bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci** 37:145-149, 2005.
18. Yasukawa K, Sawamura D, Akiyama M, Motoda N, Shimizu H: Keratotic lesions in epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. **J Am Acad Dermatol** 52:172-173, 2005.
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得  
○なし。
  2. 実用新案登録  
○なし。
  3. その他  
○なし。

図とその説明

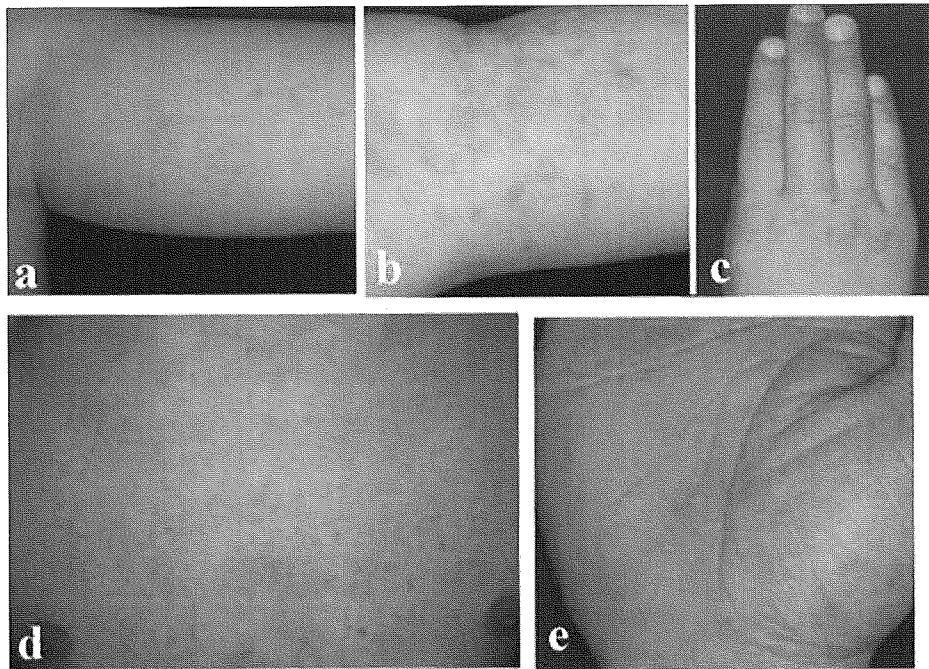


図1 症例1、2の臨床所見

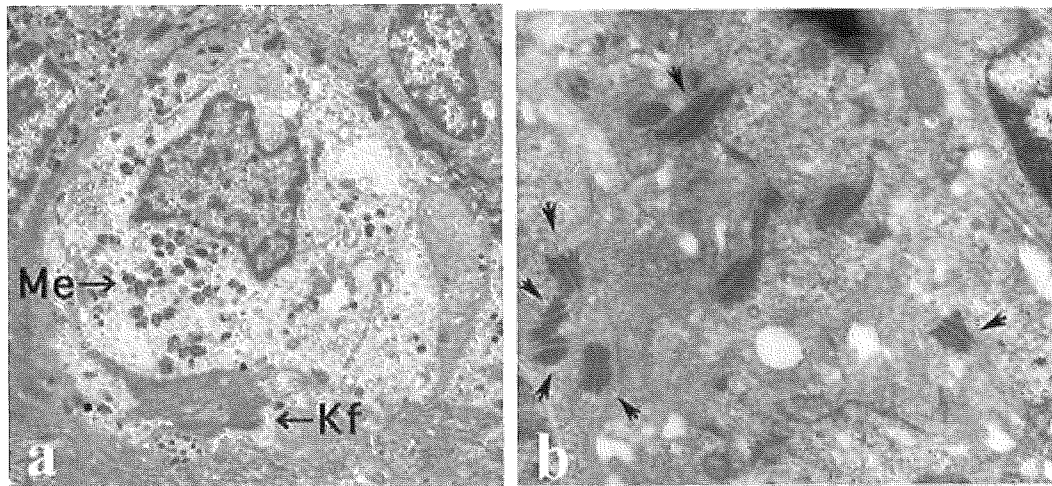


図2 電顕像 Me；メラノゾーム、Kf；ケラチン線維、↑はケラチン線維と結合不全であるデスモゾーム

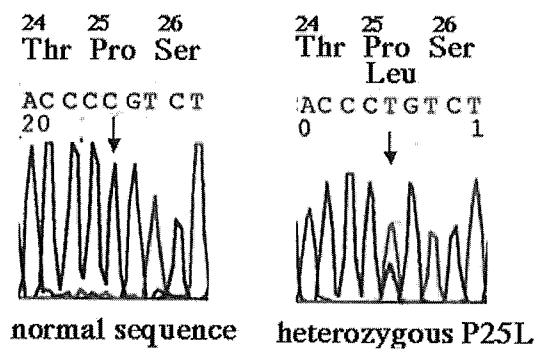


図3 ケラチン5遺伝子におけるP25L変異

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

プレクチン変異による表皮水疱症の新病型：幽門閉鎖合併単純型

分担研究者 清水 宏 北海道大学大学院医学研究科・皮膚科学分野 教授

**研究要旨** 表皮水疱症の原因遺伝子として、10の遺伝子が報告されている。今回、幽門閉鎖を合併した表皮水疱症患者を解析した。現在までに、幽門閉鎖を合併するタイプは、 $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンの変異で起こる接合部型のみであった。症例の電顕検索では、水疱が表皮内に形成され、蛍光抗体では $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンに異常がなく、プレクチン発現の著しい低下を認めた。さらに、プレクチン遺伝子の変異検索を行ったところ、症例1では、Q305Xと1395G→Aの変異が、症例2では R1189XとQ2538Xの変異が同定された。本症例は、表皮水疱症の新病型、プレクチン遺伝子の変異で起こる幽門閉鎖合併単純型と考えられた。

研究協力者

中村裕之 北海道大学大学院医学研究科・  
皮膚科病学分野  
澤村大輔 北海道大学大学院医学研究科・  
皮膚科病学分野  
後藤真希 北海道大学大学院医学研究科・  
皮膚科病学分野

A. 研究目的

表皮水疱症において、現在までに10の原因遺伝子が同定されている。一般に、プレクチンの変異では筋ジストロフィー合併単純型が生ずる。また、幽門閉鎖を合併する病型は、 $\alpha 6 \beta 4$  インテグリンの変異で起こる接合部型である。今回我々は、幽門閉鎖を合併した2例の単純型表皮水疱症患者を経験したので、報告する。

B. 研究方法

電顕的検索にて、水疱形成部位や基底膜の微細構造の異常を検討した。さらに、皮膚凍結標本を用いて基底膜関連のモノクローナル抗体S1193 (BPAG1)、HDD20 (BPAG2)、GoH3 ( $\alpha 6$  インテグリン)、3E1 ( $\beta 4$  インテグリン)、121 (プレクチン)、19DEJ1 (uncein)、GB3 (laminin

5)、LH7.2 (type VII collagen) の免疫組織学検索を行った。ならびに末梢血単核球から抽出した genomic DNA を用いてプレクチン遺伝子変異検索をダイレクトシーケンス法を用いて施行した。。  
(倫理面への配慮)

本研究は、インフォームド・コンセントに基づき、対象者に対して十分な説明を行い、書面による個人の意思に基づく任意の同意を得ており、北海道大学医学部倫理委員会で承認されている。患者およびその家族、血縁者のプライバシー、人権の保護に配慮し、学問的理由で結果を公表するときには、個人が特定できないよう十分に配慮する。たとえ解析途中でも、患者、家族、血縁者は同意を撤回でき、何ら診療上の不利益を受けないことが保証されている。

C. 研究結果

患者

症例1：1週間の男児（図1）。出生直後からびらんと水疱が出現。腹部X線にて巨大ガス像が認められたことから幽門閉鎖と診断した。兄にも同様の症状が認められている。生後4カ月で敗血症により死亡。

症例2：1カ月の女児（図2）。生下時

から略全身に水疱とびらん。腹部X線にて巨大ガス像が認められたことから幽門閉鎖と診断した。呼吸不全にて、31日目に死亡。

電顕的検索：患者皮膚生検標本での水疱形成部位は、症例1、2ともに、基底細胞内であり、単純型に一致する所見であった。

免疫組織学的検索：表皮真皮境界部において、プレクチンの発現の著しい減弱を認めた。幽門閉鎖合併接合部型表皮水疱症で現弱する $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンや、その他の基底膜蛋白の発現は正常であった(図3)。

遺伝子検索：プレクチンの発現がなかったことから、その遺伝子の変異検索を行った。その結果、症例1では、Q305Xと1395G→Aの変異が、症例2では R1189XとQ2538Xの変異が同定された。

#### D. 考察

現在までに種々の表皮水疱症の病型が報告されている。そのなかで、幽門閉鎖を合併するタイプは、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンの変異で起こる接合部型である。そのため、この2症例も幽門閉鎖があり、接合部型と予想していた。

しかしながら、電顕的検索では水疱が表皮内に形成され、単純型の所見であった。さらに、蛍光抗体法では、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンの発現は正常であり、プレクチンの発現の減弱を認めた。現在までに報告されているプレクチン欠損型は、筋ジストロフィーを併発する単純型である。そこで、患者のプレクチンの遺伝子変異検索を行った。結果は、驚くべきことに、両者にプレクチン遺伝子の新規変異を見出した。

今回の病型はプレクチンの変異で起こる新しい単純型と考えられる。過去のプレクチン遺伝子の変異の報告を見ると、過去に22例の変異の報告があり、それらはすべて筋ジストロフィー合併単純型を発症していた。今回同定された症例1の変異Q305Xと1395G→Aの組み合わせは最もN末端の近傍に存在する変異であった。症例2の

変異は過去の変異と同様な部位にあるミスセンス変異で、なぜこの変異が幽門閉鎖を起こしたかは不明であった。

一般に筋ジストロフィー合併型の筋症状発症は遅発性であることが知られている。今回の症例は、残念ながら生後短い期間で死亡している。プレクチンの変異でも特に致死的な重症の場合、幽門閉鎖を起こす可能性も考えられた。

#### E. 結論

今回、プレクチンの変異で生ずる幽門閉鎖合併単純型を報告した。現在まで、幽門閉鎖は $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンの変異で起こる接合部型に特徴的な所見であったが、その考えを新たにすべきであると考えられた。今後、本性の発症機構を詳しく検討する必要があると思われた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表(平成17年度)

論文発表 英語論文

1. Yasukawa K, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Jung SY, Kim SC, Shimizu H: Epidermolysis bullosa simplex in orientals: genetic studies in 19 cases. **Br J Dermatol** in press.
2. McMillan JR, Akiyama M, Nakamura H, Shimizu H: Colocalization of Multiple Laminin Isoforms Predominantly beneath Hemidesmosomes in the Upper Lamina Densa of the Epidermal Basement Membrane. **J Histochem Cytochem.** 54:109-118, 2006.
3. Akiyama M, Sugiyama-Nakagiri Y, Sakai K, McMillan JR, Goto M, Arita K, Tsuji-Abe Y, Tabata N, Matsuoka K, Sasaki R,

- Sawamura D, Shimizu H: Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer. **J Clin Invest** 115:1777-1784, 2005.
4. Akiyama M, Tsuji-Abe Y, Yanagihara M, Nakajima K, Kodama H, Yaosaka M, Abe M, Sawamura D, Shimizu H: Ichthyosis bullosa of Siemens: its correct diagnosis facilitated by molecular genetic testing. **Br J Dermatol** 152:1353-1356, 2005.
  5. Horiguchi Y, Sawamura D, Mori R, Nakamura H, Takahashi K, Shimizu H: Clinical heterogeneity of 1649delG mutation in the tail domain of keratin 5: a Japanese family with epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. **J Invest Dermatol** 125:83-85, 2005.
  6. Kawasaki H, Sawamura D, Nakazawa H, Hattori N, Goto M, Sato-Matsumura KC, Akiyama M, Shimizu H: Detection of 1733insC mutations in an Asian family with Birt-Hogg-Dube syndrome. **Br J Dermatol** 152:142-145, 2005.
  7. Kawashima J, Akiyama M, Takizawa Y, Takahashi S, Matsuo I, Shimizu H: Structural, enzymatic and molecular studies in a series of nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma patients. **Clin Exp Dermatol** 30:429-431, 2005.
  8. Mitsui H, Watanabe T, Komine M, Nakamura H, Shimizu H, Tamaki K: Focal palmoplantar callosities in non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa. **J Am Acad Dermatol** 52:371-373, 2005.
  9. Nakamura H, Sawamura D, Goto M, McMillan JR, Park S, Kono S, Hasegawa S, Paku S, Nakamura T, Ogiso Y, Shimizu H: Epidermolysis bullosa simplex associated with pyloric atresia is a novel clinical subtype caused by mutations in the plectin gene (PLEC1). **J Mol Diagn** 7:28-35, 2005.
  10. Natsuga K, Akiyama M, Sato-Matsumura K, Tsuchiya K, Shimizu H: Two cases of atypical melanocytic lesions in recessive dystrophic epidermolysis bullosa infants. **Clin Exp Dermatol** 30:636-639, 2005.
  11. Sawamura D, Abe R, Goto M, Akiyama M, Hemmi H, Akira S, Shimizu H: Direct injection of plasmid DNA into the skin induces dermatitis by activation of monocytes through toll-like receptor 9. **J Gene Med** 7:664-671, 2005.
  12. Sawamura D, Goto M, Shibaki A, Akiyama M, McMillan JR, Abiko Y, Shimizu H: Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect for bacterial infection. **Gene Ther** 12:857-861, 2005.
  13. Sawamura D, Goto M, Yasukawa K, Sato-Matsumura K, Nakamura H, Ito K, Tomita Y, Shimizu H: Genetic studies of 20 Japanese families of dystrophic epidermolysis bullosa. **J Hum Genet** 28:28, 2005.
  14. Shimizu A, Akiyama M, Ishiko A, Yoshiike T, Suzumori K, Shimizu H: Prenatal exclusion of harlequin ichthyosis; potential pitfalls in the



- timing of the fetal skin biopsy. **Br J Dermatol** 153:811-814, 2005.
15. Suzuki N, Suzuki T, Inagaki K, Ito S, Kono M, Fukai K, Takama H, Sato K, Ishikawa O, Abe M, Shimizu H, Kawai M, Horikawa T, Yoshida K, Matsumoto K, Terui T, Tsujioka K, Tomita Y: Mutation analysis of the ADAR1 gene in dyschromatosis symmetrica hereditaria and genetic differentiation from both dyschromatosis universalis hereditaria and acropigmentatio reticularis. **J Invest Dermatol** 124:1186-1192, 2005.
16. Tomita Y, Akiyama M, Shimizu H: Stratum corneum hydration and flexibility are useful parameters to indicate clinical severity of congenital ichthyosis. **Exp Dermatol** 14:619-624, 2005.
17. Tsuji-Abe Y, Akiyama M, Yamanaka Y, Kikuchi T, Sato-Matsumura KC, Shimizu H: Correlation of clinical severity and ELISA indices for the NC16A domain of BP180 measured using BP180 ELISA kit in bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci** 37:145-149, 2005.
18. Yasukawa K, Sawamura D, Akiyama M, Motoda N, Shimizu H: Keratotic lesions in epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. **J Am Acad Dermatol** 52:172-173, 2005.
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得  
○なし。
  2. 実用新案登録  
○なし。
  3. その他  
○なし。

図とその説明

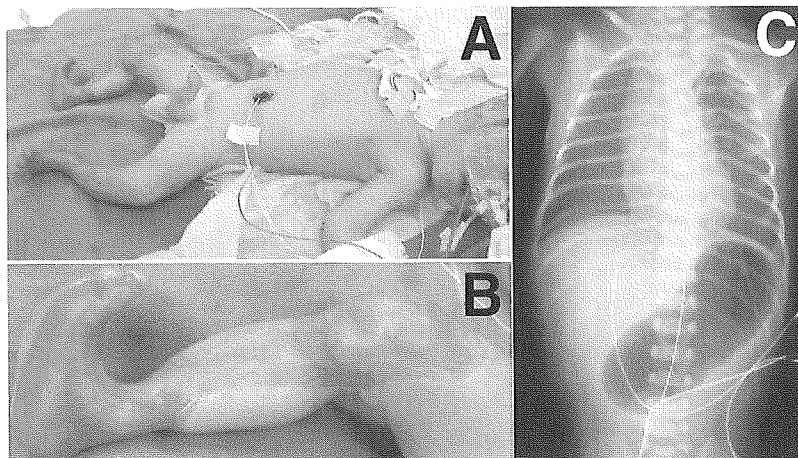


図1 症例1の臨床所見と腹部単純X線像

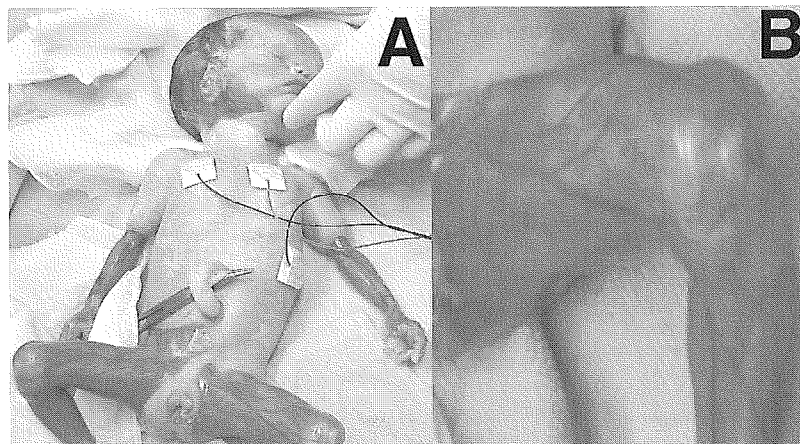


図2 症例2の臨床所見

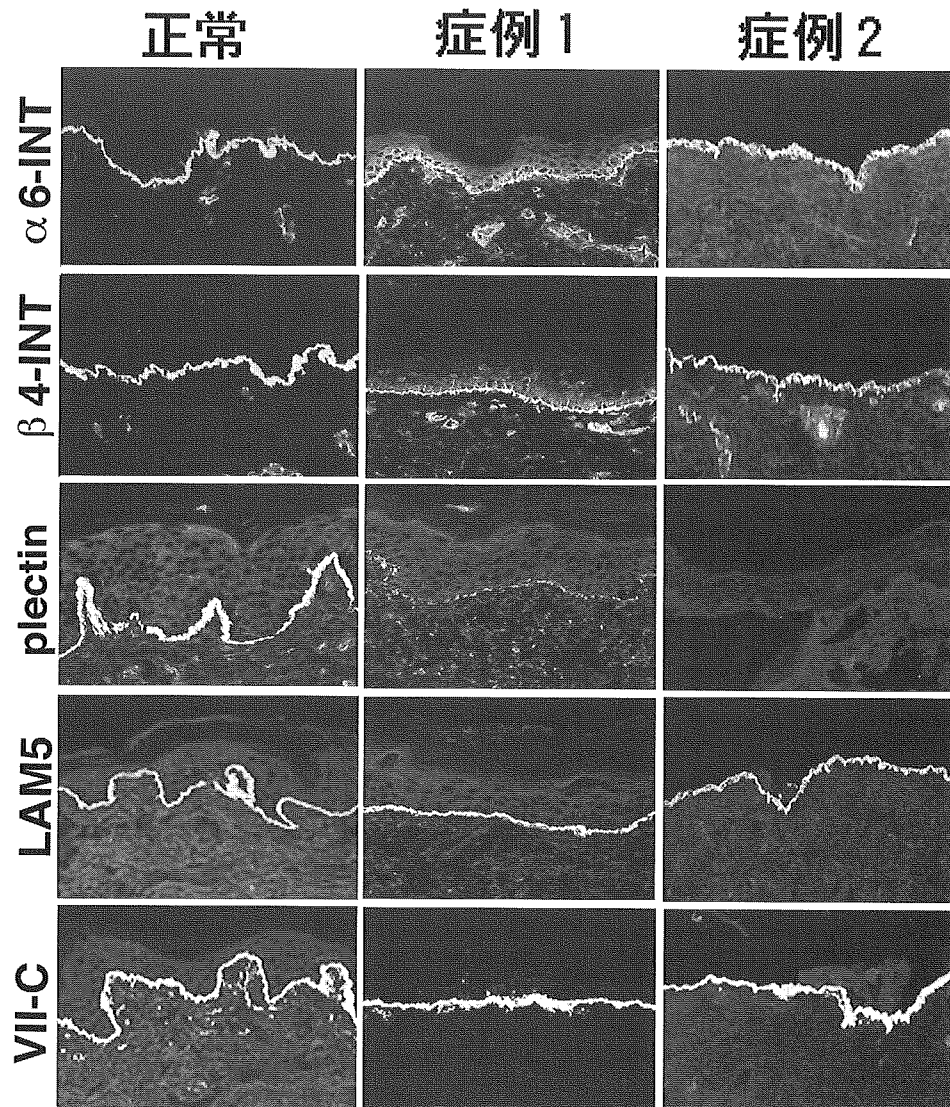


図3 蛍光抗体所見. 左から右に、正常、症例1、症例2。上から下へ $\alpha 6$ インテグリン、 $\beta 4$ インテグリン、プレクチン、ラミニン5，VII型コラーゲン。プレクチンの発現の著しい減弱。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

新しい三次元皮膚の開発

分担研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授

**研究要旨** 表皮水疱症の再生治療を改善する目的で、三次元培養皮膚の改良を行った。これまでの研究成果により、培養表皮シートは角層を欠き、基底膜構成タンパクが欠除しており生着性に問題があった。三次元培養皮膚は、基底膜構成成分は存在するが不完全であることが明らかとなった。本研究では形態的に優れた、より正常皮膚に近い新しい三次元培養皮膚の作製法を開発した。

共同研究者  
白方裕司 愛媛大学皮膚科学

討した。さらに基底膜部を電子顕微鏡にて観察した。

#### A. 研究目的

表皮水疱症の遺伝子再生医療の大きな柱の一つは遺伝子導入法の確立であり、もう一つは培養皮膚である。これまでの研究成果により、培養表皮シートは繰り返し移植することで、創傷治癒を促進することが明らかとなった。しかし、生着性については非常に低いものであることも明らかとなった。生着性の向上をはかる目的で三次元皮膚移植法を確立した。この三次元皮膚は真皮と表皮を併せ持ち、角層を有する点が特徴であり、基底膜構成成分も発現していたが、その発現は不十分であった。そこで、本研究では基底膜構成タンパクを十分発現する三次元皮膚を開発することを目的とした。

#### B. 研究方法

正常ヒト線維芽細胞をコラーゲンゲル中で培養し、5日間静置培養した。5日目に足場となる材料をゲルの上に置き、密着させるためにさらに1日間静置培養した。翌日、正常ヒト角化細胞をゲルの上に播種した。2日後に空気に曝露することにより重層化させ、7日目に組織を採取し、HE染色にて形態を観察し、免疫染色にて基底膜、表皮細胞間蛋白、ケラチンの発現を比較検

#### C. 研究結果

HE染色所見では、従来の三次元培養皮膚は基底細胞が不揃いで、角化細胞の形態が分化しやすい傾向が見られた。新しい三次元培養皮膚は基底細胞がコンパクトであり、その配列は正常皮膚により近いものであった(図)。免疫組織学的検索では、新しい三次元皮膚はケラチン10の発現は弱く、ケラチン6はほぼ全層に発現していた。E-カドヘリン、デスモグレイン1, デスモグレイン3は良好に発現しており、正常皮膚と比較すると遜色なく発現していた。一方従来の三次元皮膚ではデスモグレイン1, 3は発現がやや弱かった。4型コラーゲン、7型コラーゲン、ラミニン5, インテグリン $\alpha$ 6, インテグリン $\beta$ 4は新しい三次元皮膚では基底膜部に線状に発現していたが、従来の三次元皮膚ではその発現は部分的であった。電子顕微鏡所見では新しい三次元皮膚は線状にlamina densaが観察されたが、従来の三次元皮膚では線状のlamina densaはほとんど認めなかった。

#### D. 考察

栄養障害型表皮水疱症の最終的な治療の目標は遺伝子治療である。遺伝子治療には